УДК 619:614.48

Бодрякова М.А., Фетисов Л.Н., Зубенко А.А., Бодряков А.Н., Коваленко А.В., Лященко Л.А., Жила Е.В.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ РЯДА АМИДОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Резюме: Развитие резистентности микроорганизмов к химиотерапевтическим средствам является одной из основных проблем в терапии инфекционных болезней. Ветеринарным специалистам необходимо иметь возможность заменять неэффективные средства на препараты, к которым резистентность не развивается или для её развития необходим длительный период времени. Следствием этого является необходимость синтеза и скрининга новых соединений с высокой антимикробной активностью, низкой токсичностью, недорогих, простых в применении. Изучена антибактериальная активность новых веществ из ряда амидов жирных кислот в отношении E.coli 078 (полевой штамм), St.aureus P-209, что привело к отбору перспективных соединений, обладающих высокой специфической активностью и не оказывающих «острого» токсического действия. Амиды жирных кислот могут быть использованы в качестве активно действующих веществ при разработке новых ветеринарных препаратов.

Ключевые слова: миристиновая и пальмитиновая кислоты, амиды жирных кислот, антибактериальная активность, лекарственная устойчивость микроорганизмов.

Введение. Для ветеринарной медицины болезни молодняка животных остаются одной из самых сложных проблем в ветеринарии. Появление резистентных штаммов микроорганизмов еще более обостряет ситуацию с сохранностью молодняка сельскохозяйственных животных [1,4,7].

Проблема одинаково остра в скотоводстве, свиноводстве и птицеводстве. В России и Ростовской области в частности прилагаются усилия и затрачиваются значительные средства на восстановление и развитие животноводства. Без расширения арсенала антибактериальных и протистоцидных средств, трудно ожидать быстрого восстановления поголовья животных. Ветеринарным специалистам необходимо иметь возможность срочно менять неэффективные средства на новые, «незнакомые» возбудителю препараты, к которым резистентность не развивается или для её развития необходим длительный период времени. Следствием этого является необходимость синтеза и скрининга новых соединений с высокой антимикробной активностью, низкой токсичностью, недорогих, простых в применении [8].

Нахождение соединений нового класса с высокой антибактериальной активностью является трудной задачей, так как подобные соединения среди новых типов органических структур встречаются не часто. В качестве показательного примера можно привести результаты тестирования антибактериальной активности диверсифицированной коллекции из 150000 соединений [10], по результатам которого удалось найти лишь небольшое число соединений с достаточно выраженной активностью. Это делает весьма актуальной разработку новых антибактериальных средств [8].

Цель исследований. Поиск, направленный на разработку новых антимикробных и антипаразитарных препаратов (ААП) в ряду амидов жирных кислот. Определить антибактериальную активность и токсичность новых веществ из ряда амидов жирных кислот, установить зависимость уровня антибактеериальной активности от структурных особенностей новых веществ – наличия четвертичного атома азота, длины углеводородной цепи в формуле кислоты и структуры аминного фрагмента.

Материалы и методики. Синтез соединений осуществляли с использованием как известных методов синтеза органических соединений, описанных в многочисленных руководствах, так и с применением разработанных нами методов, изложенных в описании к нашему патенту РФ №2394824 [6] и в наших статьях и тезисах: Материалы Первой международной конференции «Химия и биологическая активность гетероциклов и алкалоидов». М.,Т.2, с.116, 2002 год; Материалы международной конференции «Синтез и биологическая активность азотсодержащих гетероциклов»., М.,2006г, с.216; Тезисы IV международной конференции «Новые направления в химии гетероциклов», С.-Петербург,

2010, с.84-92; и другие. [2]

Антимикробную активность новых соединений и препаратов сравнения определяли по методике серийных разведений в жидкой питательной среде, описанной в кн.: «Методы экспериментальной химиотерапии», М., Медицина, 1971.- С.100-105. Бактериостатическую активность каждого вещества определяли в ряду из 10 разведений от 500 мкг/мл до 0,975 мкг/мл. Учитываемая бактериальная нагрузка составляла 250 тысяч микробных клеток в 1 мл. Каждое определение проводили в двух параллельных рядах. Антимикробную активность амидов жирных кислот изучали, помимо того, на плотной питательной среде Luria-Bertani (LB) по методике, описанной в кн.: «Современная антимикробная химиотерапия: руководство для врачей», М.,2002. Исходные суспензии, содержащие 10 9 микробных клеток (м.кл.) в 1 мл забуференного физиологического раствора (ЗФР), готовили по оптическому стандарту плотности (Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. А.Н. Тарасевича) из суточной агаровой культуры. Бактериальные суспензии разводили в ЗФР до концентрации 107 м.кл. Для тестирования антимикробной активности изучаемых веществ использовали классический метод двукратных серийных разведений в плотной питательной среде LB, к которой добавляли препараты, растворенные в ДМСО (диметилсульфоксид), в концентрации 200 – 6,3 мкг/мл. В качестве контроля использовали среду LB без препаратов, а также среду, содержащую, вместо препаратов, максимальное количество ДМСО, использованное в эксперименте. Суспензии бактерий, содержащие 107микробных клеток в ЗФР, высевали на пластины агара, содержащего разные концентрации препаратов, в количестве 0,1 мл. Результаты учитывали после 1-3-суточного термостатирования при 37оС. Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) препаратов определяли по минимальной концентрации вещества в среде, на которой отсутствовал рост микроорганизмов (тест-бактерий).

Токсичность новых соединений определяли по методике Машковского М.Д., описанной в кн.: «Методы экспериментальной химиотерапии». М.: «Медицина», 1971. – С.524-531.

Результаты исследований

Синтезированы соединения ряда амидов жирных кислот.

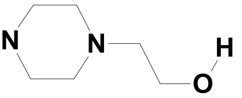
Общей формулы 1

CH_3-(CH_2)n-(C=O)-R

1(a-n)

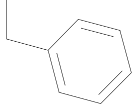
1a n=10 R= NH-CH2-CH2-CH2-N-(CH3)2

1b n=10 R=



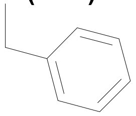
1c n=12 R= NH-CH2-CH2-CH2-N-(CH3)2

1d n=12 R= NH-CH2-CH2-CH2-N⁺-(CH3)2 Cl⁻

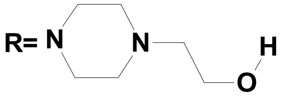


1f n=14 R= NH-CH2-CH2-CH2-N-(CH3)2

1g n=14 R= NH-CH2-CH2-CH2-N⁺-(CH3)2 Cl⁻

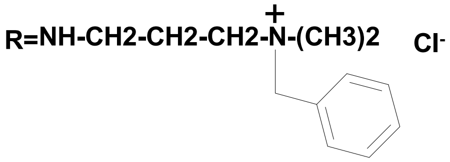


1k n=14

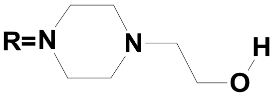


1l n=16 R=NH-CH2-CH2-CH2-N-(CH3)2

1m n=16



1n n=16



CH_3-$(CH_2)_7$-CH=CH-$(CH_2)_7$-(C=O)- NH-CH2-CH2-CH2-N-(CH3)2

2

Результаты определения бактериостатической активности новых соединений представлены в таблице 1.

Таблица 1
Минимальная бактериостатическая концентрация новых соединений
(Minimum bacteriostatic concentration of new compounds)

Кислота, применяемая в синтезе амида	Соединение	Минимальная ингибирующая концентрация, мкг/мл	
		St. Aureus P-209	*E. coli 078*
Лауриновая	1a	62,50	31,25-62,50
	1b	125,0	62,50
Миристиновая	1c	6,25	6,25
	1d*	3,12-6,25	6,25-12,5
	1e	3,12	6,25
	1f	1,60	3,20
Пальмитиновая	1g	6,25	12,50
	1k	6,25	12,50
	1l	6,25	12,50
Стеариновая	1m	31,25	62,50
	1n	31,25	62,50
Олеиновая	2	12,50	6,25-12,50
Левомицетин	-	25,00	100,0
Окситетрациклина гидрохлорид	-	50	100,0
Контроль с растворителем	-	-	-

*- соединение является активно действующим началом известного препарата Мирамистин.

Данные табл.1 показывают, что производные миристиновой (С 14) и пальмитиновой (С16) кислот проявляют более высокую бактериостатическую активность, чем производные лауриновой (С12) и стеариновой (С18) кислот, то есть установлена зависимость антибактериальной активности соединений этого класса от длины углеводородной цепи. Наличие или отсутствие четвертичного атома азота, а также структура аминного фрагмента в изученных соединениях не определяют уровень их антибактериальной активности.

Поиск антибактериальных препаратов в этом ряду целесообразно продолжить, применяя другие амины для синтеза амидов, указанных кислот. Важно, что найденные нами антибактериальные препараты обладают также высокой протистоцидной активностью. Установление у новых соединений двойного эффекта не исключает возможность применения их как комплексных средств при ассоциированных бактериально-паразитарных заболеваниях [11]. Особое значение для ветеринарии будут иметь эти соединения вследствие их не антибиотического происхождения [5].

Введение в желудок соединений в виде водных растворов в максимально возможном объёме (3мл) в концентрации 5% не вызывает у лабораторных крыс токсической реакции. Вследствие низкой токсичности изученных соединений не удалось определить такие параметры «острой» токсичности, как МПД (максимально переносимая доза), ЛД50 (теоретически ЛД50 составляет более 2 г/кг массы тела) и ЛД100. Выпаивание 0,01% водных растворов соединений в течение 30 дней не вызывает у лабораторных животных развитие токсических изменений. Полученные данные позволяют отнести изученные соединения к малотоксичным.

Выводы.

Изученные соединения проявляют высокую бактериостатическую активность в отношении E.coli 078 и St.aureus P-209, не оказывают «острого» токсического действия. Амиды жирных кислот могут быть использованы в качестве активно действующих веществ, при разработке новых ветеринарных препаратов.

Библиография

1. Астахова, Д.А. Гемодинамические расстройства у поросят при колибактериозе и их коррекция: Автореф. дис. … канд. вет. наук. / Д.А. Астахова – Новочеркасск, 2010. – 25 с.
2. Галимова, В.З. Микробиоценоз кишечника и микробиологическиепоказатели мяса кроликов при ассоциативной болезни и после лечения / В.З. Галимова, А. М., Асадуллина, Галиуллина И.И. // Материалы докладов в научной конференции «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». Москва, 2012. – Вып. 13.- С. 122-115
3. Зубенко, А.А. 1,2,4-[3,4-а]-фталазины: синтез, инсектицидная и фунгицидная активность / А.А. Зубенко, Л.Н. Фетисов, И.В., Зубенко, Е.А. Саяпина // Материалы международной конфернции «Химия и биологическая активность синтетических и природных соединений». – М., 2006. – С. 216
4. Косенко, Ю.М. Экспериментальная и клиническая фармакология препаратов на основе циминаля: Автореф. дисс. … докт. биол. наук. / Ю.М. Косенко - Воронеж, 2009. – 42 с.
5. Морковник, А.С. 1- -Арилоксиалкил- и 1-бензил-2-иминобензимидазолидины как антиинфекционные препараты с широким спектром активности / А.С. Морковник, Л.Н. Диваева, А.А Зубенко [и др.] // Материалы 1-й Российской конференции по медицинской химии. – М., 8-12 сентября 2013. – С. 45-46.
6. Патент РФ №2394824. Производные пиридо [1,2-а]-бензимидазола, обладающие антибактериальным действием, и способ их получения / Зубенко А.А., Фетисов Л.Н, Папов Л.Д. [и др.] - №2008151859/04; заявл. 25.12.2008, Опубл. 20.07.2010. Бюл.№20. – с. 5
7. Тягнибедина, Н.И. Фармако-токсикологические свойства и терапевтическая эффективность инъекционной формы азитромицина: Автореф. дисс. канд. биол. наук. / Н.И. Тягнибедина - Москва, 2013. – 22 с.
8. Фетисов, Л.Н. Лечебно-профилактическая эффективность препаратов из класса азотсодержащих гетероциклов с пиридиновым атомом азота при колибактериозе телят: Автореф. дис. канд. вет. наук. / Л.Н. Фетисов - Новочеркасск, 2013. – 25 с.
9. Acres S.D. J.Dairy Sc., 1985,681, P.223-256
10. R. De La Fuente, N.D. Sonawane, D. Arymainayagam, A.S. Verkman, Brit. J. Pharmacol., 2006,v.149, 551 – 559.
11. Steven P. Pakes, Lauretta W. Gerrity Protozoal Diseases The Biology of the Laboratory Rabbit (Second Edition), CHAPTER 10 - 1994, Pages 205-229

References

1. Astahova, D.A. Gemodinamicheskie rasstrojstva u porosjat pri kolibakterioze i ih korrekcija [Hemodynamic disorders in piglets with colibacillosis and their correction]: Avtoref. dis. … kand. vet. nauk. / D.A. Astahova – Novocherkassk, 2010. – 25 p.
2. Galimova, V.Z. Mikrobiocenoz kishechnika i mikrobiologicheskiepokazateli mjasa krolikov pri associativnoj bolezni i posle lechenija [Microbiocenosis of intestine and microbiological characteristics of rabbit meat at associative disease and after treatment] / V.Z. Galimova, A. M., Asadullina, Galiullina I.I. // Materialy dokladov v nauchnoj konferencii «Teorija i praktika bor›by s parazitarnymi boleznjami». Moskva, 2012. – No. 13.- P. 122-115
3. Zubenko, A.A. 1,2,4-[3,4-a]-ftalaziny: sintez, insekticidnaja i fungicidnaja aktivnost› [1,2,4 - [3,4-a]-phthalazines: Synthesis, insecticidal and fungicidal activity] / A.A. Zubenko, L.N. Fetisov, I.V., Zubenko, E.A. Sajapina // Materialy mezhdunarodnoj

konferncii «Himija i biologicheskaja aktivnost› sinteticheskih i prirodnyh soedinenij». – M., 2006. – P. 216
4. Kosenko, Ju.M. Eksperimental›naja i klinicheskaja farmakologija preparatov na osnove ciminalja [Experimental and clinical pharmacology of drugs based on tsiminal']: Avtoref. diss. … dokt. biol. nauk. / Ju.M. Kosenko - Voronezh, 2009. – 42 p.
5. Morkovnik, A.S. 1-ω-Ariloksialkil- i 1-benzil-2-iminobenzimidazolidiny kak antiinfekcionnye preparaty s shirokim spektrom aktivnosti [1-ω-aryloxyalkyl- and 1-benzyl-2-iminobenzimidazolidiny as antiinfective medications with a broad spectrum of activity] / A.S. Morkovnik, L.N. Divaeva, A.A Zubenko [i dr.] // Materialy 1-j Rossijskoj konferencii po medicinskoj himii. – M., 8-12 sentjabrja 2013. – P. 45-46.
6. Patent RF №2394824. Proizvodnye pirido [1,2-a]-benzimidazola, obladajushhie antibakterial›nym dejstviem, i sposob ih poluchenija [Pyrido [1,2-a] benzimidazole have an antibacterial effect, and a method their preparation] / Zubenko A.A., Fetisov L.N, Papov L.D. [i dr.] - №2008151859/04; zajavl. 25.12.2008, Opubl. 20.07.2010. Bjul.№20. – P. 5
7. Tjagnibedina, N.I. Farmako-toksikologicheskie svojstva i terapevticheskaja jeffektivnost› in"ekcionnoj formy azitromicina [Pharmaco-toxicological properties and therapeutic efficacy of the injectable form of azithromycin]: Avtoref. diss. kand. biol. nauk. / N.I. Tjagnibedina - Moskva, 2013. – 22 p.
8. Fetisov, L.N. Lechebno-profilakticheskaja effektivnost› preparatov iz klassa azotsoderzhashchih geterociklov s piridinovym atomom azota pri kolibakterioze teljat [Therapeutic and prophylactic efficacy of a class of nitrogen-containing heterocycles with the pyridine nitrogen atom at kolibakterioze calves]: Avtoref. dis. kand. vet. nauk. / L.N. Fetisov - Novocherkassk, 2013. – 25 p.
9.-11. Vide supra.

UDC 619:614.48

Bodryakova M.A.,L.N. Fetisov, Zubenko A.A., Bodryakov A.N., Kovalenko A.V., Lyaschenko L.V., Zhila E.V.

DETERMINATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF NEW AGENTS FROM FATTY ACID AMIDES SERIES

SUMMARY
Development of resistance to chemotherapeutic agents in microbiota is one of the major challenges of infectious diseases therapy. Veterinary specialists need resources to substitute inefficient agents with drugs to which resistance development is impossible or takes much time. Hence it is necessary to synthesize and screen new agents with high antimicrobial activity, low toxicity, inexpensive, and easy-to-use. Antibacterial activity of new agents from fatty acid amides series was studied on E. coli 078 (field strain) and St.aureus P-209, leading to selection of prospective compounds with high specific activity and no acute toxic effect. Fatty acid amides have potential to be used as active ingredients for new veterinary preparations.

Keywords: myristic and palmitic acids, fatty acid amides, antibacterial activity, drug resistance.

Контактная информация об авторах для переписки

Бодрякова Мария Анатольевна, соискатель, м.н.с межлабораторного диагностического центра ГНУ СКЗНИВИ Россельхозакадемии; 346421 Ростовская область г. Новочеркасск Ростовское шоссе, 0; Тел. 8 (951) 829-01-95; E-mail: mbodryakova@bk.ru

Фетисов Леонид Николаевич, с.н.с. лаборатории химического синтеза ГНУ СКЗНИВИ Россельхозакадемии; 346405 Россия, Ростовская обл., г.Новочеркасск, ул Степная, 37; Тел. 8 (908) 197-82-24; E-mail: leonidfetisow@yandex.ru

Зубенко Александр Александрович, кандидат химических наук, заведующей лабораторией химического синтеза ГНУ СКЗНИВИ Россельхозакадемии; 346421 Ростовская область г. Новочеркасск ул. Ветеринарная д.20 кв.6; Тел. 8 (928) 604-97-43; E-mail: alexsandrzubenko@yandex.ru

Бодряков Анатолий Николаевич, кандидат ветеринарных наук, с.н.с. лаборатории химического синтеза ГНУ СКЗНИВИ Россельхозакадемии; 346421 Ростовская область г. Новочеркасск Ростовское шоссе, 0; Тел. 8 (919)876-15-14; E-mail: abodryakov@yandex. ru

Коваленко Александр Владимирович, доктор ветеринарных наук, заместитель директора ГНУ СКЗНИВИ Россельхозакадемии по научной работе; Адрес: 346421 Ростовская область г. Новочеркасск Ростовское шоссе, 0 Тел. 8 (906) 429-18-29 E-mail: skznivi@novoch.ru

Лященко Любовь Аведисовна, соискатель, ветеринарный врач ГБУ РО Ростовская городская СББЖ Ветеринарная лечебница №3; 346735 Роствская область Аксайский р-н п. Рассвет ул. Светлая, 16; Тел. 8 (928) 101-77-44; E-mail: laisa.vr@bk.ru

Жила Елена Викторовна, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, ученый секретарь ГНУ СКЗНИВИ Россельхозакадемии, заведующая аспирантурой; 346405 Ростов-

ская область г. Новочеркасск ул. Бердичевского д.9 кв.36; тел. 8-(928)-108-55-12; E-mail zhila.elena7777@yandex.ru

Ответственный за переписку с редакцией: **Зубенко Александр Александрович**, заведующей лабораторией химического синтеза, 346421 г. Новочеркасск, Ростовское шоссе,0, т./ф.8(86352)6-62-70. E-mail: alexsandrzubenko@yandex.ru

Bodryakova Mariya A., competitor, junior researcher interlaboratory diagnostic center North-Caucasus Zone Research Veterinary Institute, RAAS; 346421 Novocherkassk, Rostov region Rostov highway, 0; phone 8 (951) 829-01-95; E-mail: mbodryakova@bk.ru

Fetisov Leonid N., senior researcher laboratory chemical synthesis North-Caucasus Zone Research Veterinary Institute, RAAS; 346405 Russia, Rostov region., Novocherkassk, Stepnaja street, 37; phone 8 (908) 197-82-24; E-mail: leonidfetisow@yandex.ru

Zubenko Alexander A., Ph.D. of chemical science, head of the laboratory of chemical synthesis North-Caucasus Zone Research Veterinary Institute, RAAS; 346421 Novocherkassk, Rostov region str. Veterinary d.20 ap.6; phone 8 (928) 604-97-43; E-mail: alexsandrzubenko@yandex.ru

Bodryakov Anatoliy N., candidate of veterinary sciences, senior researcher laboratory chemical synthesis North-Caucasus Zone Research Veterinary Institute, RAAS; 346421 Novocherkassk, Rostov region Rostov highway, 0; phone 8 (919) 876-15-14; E-mail: abodryakov@yandex.ru

Kovalenko Alexander V., Doctor of Veterinary Science, deputy director of the North-Caucasus Zone Research Veterinary Institute for Research; 346421 Novocherkassk, Rostov region Rostov highway, 0; phone8 (906) 429-18-29 E-mail: skznivi@novoch.ru

Lyashchenko Lyubov' A., veterinarian GBU PO Rostov city SBBZH Veterinary hospital number 3; 346735 Rostov region Aksai red. Rassvet, st. Svetlaya, 16; phone 8 (928) 101-77-44; E-mail: laisa.vr@bk.ru

Zhila Elena V., candidate of agricultural sciences, scientific secretary of the North-Caucasus Zone Research Veterinary Institute, RAAS, Head of the Graduate School; 346405 Novocherkassk, Rostov region str. Berdichevsky d.9 kv.36; tel. 8-(928) -108-55-12; E-mail: zhila.elena7777@yandex.ru

Responsible for correspondence with the editorial board: **Zubenko Alexander A.**, Ph.D. of chemical science, head of the laboratory of chemical synthesis North-Caucasus Zone Research Veterinary Institute, RAAS; 346421 Novocherkassk, Rostov region str. Veterinary d.20 ap.6; phone 8 (928) 604-97-43; E-mail: alexsandrzubenko@yandex.ru

УДК 636.4

Погодаев В.А., Комлацкий Г.В.

АДАПТАЦИОННЫЕ СПОСОБНОСТИ СВИНЕЙ ДАТСКОЙ СЕЛЕКЦИИ НА КУБАНИ

Резюме: изучены адаптационных способностей импортных свинок датской селекции пород: ландрас (Л), дюрок (Д) и помесей ландрас х йоркшир (ЛхЙ), в условиях современной промышленной технологии Кубани. Экспериментальные исследования показали, что гематологические показатели крови импортных животных варьировали в пределах нормы. Однако, незначительное повышение содержания лейкоцитов у завезенных животных (Л, ЛхЙ и Д) на 0,46; 0,41 и 0,21х109/л соответственно, по сравнению с местными (КБ), говорит о том, что организм испытывает некоторое «напряжение», а функция иммунитета несколько нарушена. Небольшое повышение количества эритроцитов у импортных пород – 6,87х1012/л; 6,75х1012/л и 6,82х1012/л против 6,22х1012/л, также указывает на протекающие процессы в организме животных по нор-